

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.003

· 基础研究 ·

siRNA 敲减 NEK2 表达可提高结直肠癌细胞对 5-FU 的化疗敏感性

崔发财¹, 陈瑜², 毋小玉¹, 胡敏¹, 朱亚¹, 刘凤珍¹ (1. 河南省人民医院暨郑州大学人民医院 检验科, 河南 郑州 450003; 2. 郑州大学附属肿瘤医院 病理科, 河南 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 探讨敲减中心体相关激酶 2 (never in mitosis A-related kinase 2, NEK2) 对结直肠癌细胞 5-FU 化疗敏感性的影响及其可能的机制。**方法:** 采用 qPCR 和 Western blotting 检测结直肠癌细胞中 NEK2 mRNA 及蛋白的表达水平。构建针对 NEK2 基因的小干扰 RNA (siRNA) 并转染至结直肠癌细胞 HCT116 及 SW620, 实验分为阳性干扰组 1 (转染 NEK2 siRNA1)、阳性干扰组 2 (转染 NEK2 siRNA2) 和阴性对照组 (转染 si-NC), 均用 5-FU 处理。采用 CCK-8 实验、V-FICT/PI Annexin 双染色流式细胞术实验观察敲减 NEK2 基因对 5-FU 作用下结肠癌细胞的增殖、周期分布及凋亡的影响, 采用 Western blotting 检测敲减 NEK2 基因对 5-FU 作用下结直肠癌细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响。**结果:** NEK2 蛋白及 mRNA 在结直肠癌细胞 HCT116、SW620 中均呈高表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 转染 NEK2 siRNA 可高效抑制 HCT116、SW620 细胞中 NEK2 蛋白及 mRNA 表达 (均 $P < 0.01$)。经不同浓度 5-FU 作用后, 阳性干扰组 1 和阳性干扰组 2 的细胞存活率和 IC_{50} 均显著低于阴性对照组 (均 $P < 0.01$), 细胞发生 G0/G1 期阻滞且凋亡率显著升高 (均 $P < 0.01$), 胞核 β -catenin、c-myc 和 cyclin D1 表达水平显著下降而胞质 β -catenin 表达水平升高 (均 $P < 0.01$)。**结论:** 敲减 NEK2 基因可有效提高人结直肠癌细胞对 5-FU 的化疗敏感性, 该作用可能是通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达来实现的。

[关键词] 中心体相关激酶 2; 小干扰 RNA; 结直肠癌; 5-FU; 化疗敏感性

[中图分类号] R735.3; R730.54; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1213-07

siRNA knocking down the expression of NEK2 gene enhances the chemosensitivity of colorectal carcinoma cells to 5-FU

CUI Facai¹, CHEN Yu², WU Xiaoyu¹, HU Min¹, ZHU Ya¹, LIU Fengzhen¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Henan Provincial People's Hospital & People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Department of Pathology, Tumor Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of RNA interfering NEK2 (NIMA-related kinase 2) gene on the sensitivity of colorectal carcinoma (CRC) cell lines to 5-fluorouracil (5-FU) and the possible mechanisms. **Methods:** The mRNA and protein expressions of NEK2 in CRC cell lines were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting assay, respectively. siRNAs targeting NEK2 were constructed and transfected into CRC HCT116 and SW620 cells. The experiments were divided into positive interference group 1 (transfection with NEK2 siRNA1), positive interference group 2 (transfection with NEK2 siRNA2) and negative control group (transfection with si-NC), all the CRC cells were treated with 5-FU. CCK-8 assay, Flow cytometry and V-FICT/PI Annexin staining analysis were used to observe the effects of NEK2 gene knockdown on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of CRC cells under 5-FU treatment. Western blotting was used to detect the effects of NEK2 gene knockdown on the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins in CRC cells under 5-FU treatment. **Results:** NEK2 was highly expressed in CRC HCT116 and SW620 cells at both protein and mRNA levels (all $P < 0.05$). siRNA NEK2 transfection could effectively inhibit the protein and mRNA expressions of NEK2 in HCT116 and SW620 cells (all $P < 0.01$). After treatment with various concentrations of 5-FU, the cell survival rate and IC_{50} , as well as the expression levels of β -catenin (cytoblasts), C-MYC and Cyclin D1, in the positive interference group 1 and 2 were significantly decreased, while cell cycle blockage at G0/G1 phase, the apoptosis rate and the expression level of β -catenin (cytoplasm) were significantly increased (all $P < 0.01$), as compared with the negative control group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Silencing NEK2 gene can effectively improve the sensitivity of human colorectal cancer cells to 5-FU, which

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划资助项目 (No. 201702246)。Project supported by the Medical Science and Technology Research Program of Henan Province (No. 201702246)

[作者简介] 崔发财 (1985-), 男, 硕士, 主管技师, 主要从事消化道肿瘤的早期诊断及转移预警研究, E-mail: cuifacai1@163.com

[通信作者] 毋小玉 (WU Xiaoyu, corresponding author), 副主任技师, 主要从事疾病的临床生物化学诊断的研究, E-mail: 47509197@qq.com

may be achieved by regulating the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins.

[Key words] NIMA-related expressed kinase 2; small interference RNA; colorectal cancer; 5-fluorouracil; chemosensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1213-1219. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.003]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,在中国的患病率和病死率分别居于第三位和第五位^[1]。尽管近年来在诊断和治疗技术上取得了较好的进展,但进展期CRC尤其伴发远端转移的患者预后仍然较差^[2]。目前手术切除结合辅助化疗是临床治疗CRC的主要手段,而肿瘤化疗耐药性的产生是影响患者预后的主要原因^[3],因此阐明CRC化疗耐药机制对发现新的预后标志物及治疗靶点是至关重要的。中心体相关激酶2(never in mitosis A related kinase 2, NEK2)是多种细胞周期调控蛋白的激酶,在维持有丝分裂进展、双极纺锤体形成及促进G2/M期细胞中心体分离方面发挥重要作用^[4]。NEK2异常活化将导致调解中心体的复制失败而出现染色体不稳定和非整倍体,进而参与肿瘤进程^[5]。此外,NEK2表达异常还与一些肿瘤细胞化疗耐药性的产生相关^[6-7]。目前,NEK2基因对CRC化疗耐药的影响鲜有报道。本研究通过构建NEK2的siRNA并转染CRC细胞,探讨敲减NEK2基因对CRC细胞5-FU化疗敏感性的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人CRC细胞株HCT116、HT-29、SW480、SW620和人正常结肠黏膜细胞株FHC均保存于河南省人民医院中心实验室。胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司,TRIzol、qPCR试剂盒及反转录试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成,CCK-8试剂盒及5-FU均购自美国Sigma-Aldrich公司,碘化丙啶(PI)及Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物公司,兔抗人NEK2多克隆抗体和兔抗人 β -catenin、c-myc、cyclin D1、GAPDH单克隆抗体以及Lamin均购自武汉云克隆科技股份有限公司,脂质体转染试剂LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司。NEK2基因的2条阳性干扰序列和阴性对照序列均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 siRNA序列构建及细胞转染

NEK2基因的2条阳性干扰序列和阴性对照序列正义链序列:NEK2 siRNA1(5'-GCUUGUUUCUGAAGU GAAUTT-3'),NEK2 siRNA2(5'-GCCAAGCCCUGU-CAGAUATT-3'), si-NC(5'-AAGTAGCCGAGCTTC-

GATTGC-3')。将对数生长期的CRC细胞以 2×10^5 个/孔接种至6孔培养板,置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h。待细胞达到70%~80%汇合时,将细胞分为阴性对照组(si-NC)、阳性干扰组1(NEK2 siRNA1)和阳性干扰组2(NEK2 siRNA2),按照LipofectamineTM2000脂质体试剂盒说明书分别将si-NC、NEK2 siRNA1和NEK2 siRNA2转染细胞,转染后培养48 h,采用Western blotting(WB)和qPCR验证转染效果。

1.3 qPCR实验检测NEK2 mRNA在CRC细胞中的表达水平

细胞生长汇合度为80%~90%时收集细胞,根据TRIzol操作说明书提取细胞总RNA,根据反转录试剂盒和荧光定量试剂盒操作说明书进行qPCR反应。引物序列:NEK2正向为5'-TGCTTCGTGAACT-GAAACATCC-3',GAPDH正向为5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'。qPCR反应条件为逆转录反应42℃ 60 min,70℃ 10 min,冰上降温;PCR预变性95℃ 10 min,然后95℃ 15 s、60℃ 60 s,每20 s升温1℃,共40次循环。根据目的基因NEK2和内参基因GAPDH测得的CT值差异,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ)法计算NEK2的相对表达量。

1.4 CCK-8实验检测敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞生存率及IC₅₀的影响

各组细胞以 5×10^4 个/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁后更换含1、5、10、20 μ mol/L 5-FU的培养液继续培养48 h,加入CCK-8试剂孵育4 h后应用酶标仪测定450 nm处的光密度(D)值,分别计算各组细胞生存率及5-FU抑制细胞的IC₅₀值。

1.5 流式细胞术检测敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞周期分布的影响

各组细胞以 5×10^5 个/ml接种于培养瓶中常规培养,待细胞贴壁后加入含10 μ mol/L 5-FU的PRMI 1640培养液继续培养48 h,胰酶消化并收集细胞,离心、取细胞沉淀,PBS洗涤2次,细胞经预冷的70%乙醇于4℃下固定18 h,离心弃去固定液,PBS洗涤3次,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,加入100 μ l PI液及100 μ l RNA酶,37℃避光孵育30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 V-FICT/PI Annexin双染流式细胞术检测敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞凋亡的影响

各组细胞以 5×10^5 个/ml接种于培养瓶中常规培养,待细胞贴壁后加入含10 μ mol/L 5-FU的PRMI 1640培养液继续培养48 h,胰酶消化并收集细胞,离

心、取细胞沉淀,PBS洗涤2次,细胞经预冷的70%乙醇于4℃下固定18 h,离心弃去固定液,PBS洗涤3次,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,加入5 μ l Annexin V-FITC和10 μ l PI,室温避光反应5~10 min,流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

1.7 WB检测敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞NEK2、 β -catenin、c-myc和cyclin D1蛋白表达的影响

各组细胞以 5×10^5 /ml接种于培养瓶中常规培养,待细胞贴壁后加入含10 μ mol/L 5-FU的PRMI 1640培养液继续培养48 h,收集细胞,加入细胞裂解液,裂解细胞并提取细胞总蛋白,取50 μ g蛋白进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳1.5 h;然后将蛋白转移到PVDF膜上,加入1% BSA封闭过夜,加入NEK2(1:500)、细胞核 β -catenin(1:200)、细胞质 β -catenin(1:500)、c-myc(1:500)、cyclin D1(1:400)、GAPDH(1:1 000)及Lamin(1:600)等一抗,于37℃孵育2 h,TBST漂洗,加入1:1 000稀释的羊抗兔二抗于37℃孵育1 h;将PVDF膜浸于1 ml显色液中避光约

10 min后观察结果。蛋白分离条带的灰度值利用Image-Pro Plus5.0软件进行分析,蛋白相对表达量为目的蛋白与内参蛋白的比值(GAPDH作为胞质蛋白内参,Lamin作为胞核蛋白内参)。

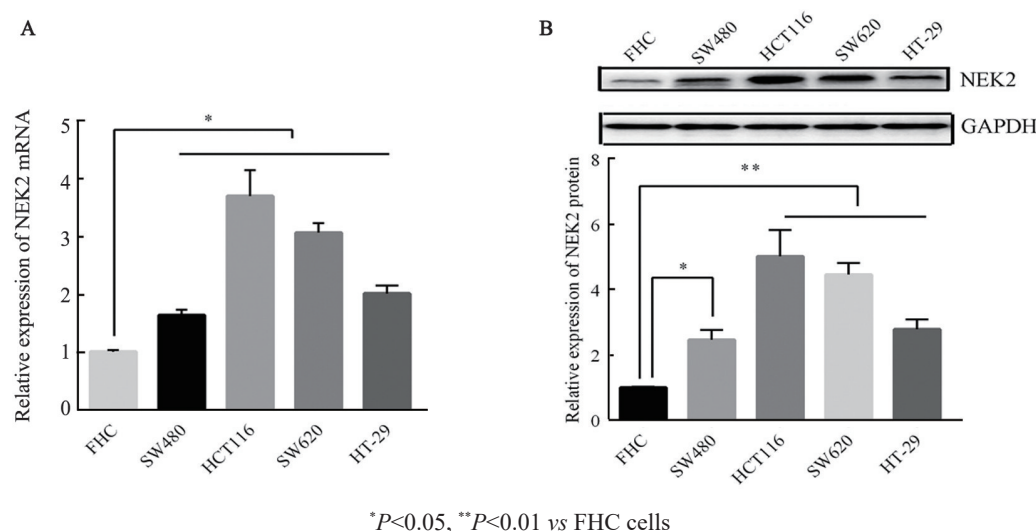
1.8 统计学处理

本研究中的各项实验均独立重复3次。应用SPSS17.0进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数差异的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NEK2 mRNA和蛋白在CRC细胞中呈高表达

qPCR和WB检测(图1)显示,NEK2 mRNA及蛋白在CRC细胞SW480、HCT116、SW620和HT-29中的表达量均显著高于正常结直肠黏膜细胞FHC($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且在HCT116细胞中表达量为最高。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs FHC cells
A: The mRNA expression of NEK2 in CRC cell lines were detected by qPCR;
B: The protein expression of NEK2 in CRC cell lines were detected by WB

图1 NEK2 mRNA和蛋白在CRC细胞中的表达

Fig.1 The mRNA and protein expressions of NEK2 in CRC cells

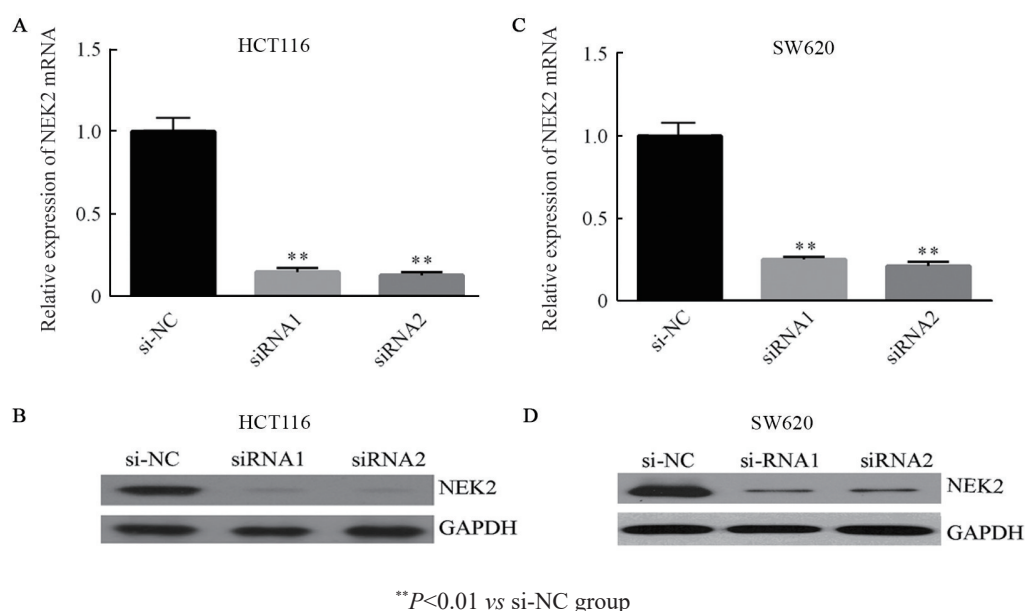
2.2 转染NEK2 siRNA可显著降低HCT116、SW620细胞中NEK2 mRNA及蛋白的表达水平

qPCR和WB检测结果显示,在HCT116细胞中,NEK2 mRNA在阳性干扰组1和阳性干扰组2中的相对表达水平均显著低于阴性对照组(均 $P < 0.01$,图2A),NEK2蛋白在阳性干扰组1和阳性干扰组2中的相对表达水平也显著低于阴性对照组[(0.14 ± 0.03)、(0.08 ± 0.03) vs (1.03 ± 0.03),均 $P < 0.01$,图2B];在SW620细胞中,NEK2 mRNA在阳性干扰组1和阳性干扰组2的相对表达水平均显著低于阴性对照组(均 $P < 0.01$,图2C),NEK2蛋白

在阳性干扰组1和阳性干扰组2中的相对表达水平也显著低于阴性对照组[(0.18 ± 0.03)、(0.14 ± 0.01) vs (1.05 ± 0.02),均 $P < 0.01$,图2D]。

2.3 敲减NEK2增强5-FU对CRC细胞增殖的抑制

CCK-8实验结果显示,经1、5、10、20 μ mol/L的5-FU处理实验组细胞48 h后,阳性干扰组1和阳性干扰组2细胞生存率显著低于阴性对照组(均 $P < 0.05$),并且随着化疗药物浓度的增加,细胞生存率降低越明显;此外,5-FU抑制阳性干扰组1和阳性干扰组2细胞的 IC_{50} 值也发生显著降低(均 $P < 0.01$),见图3。

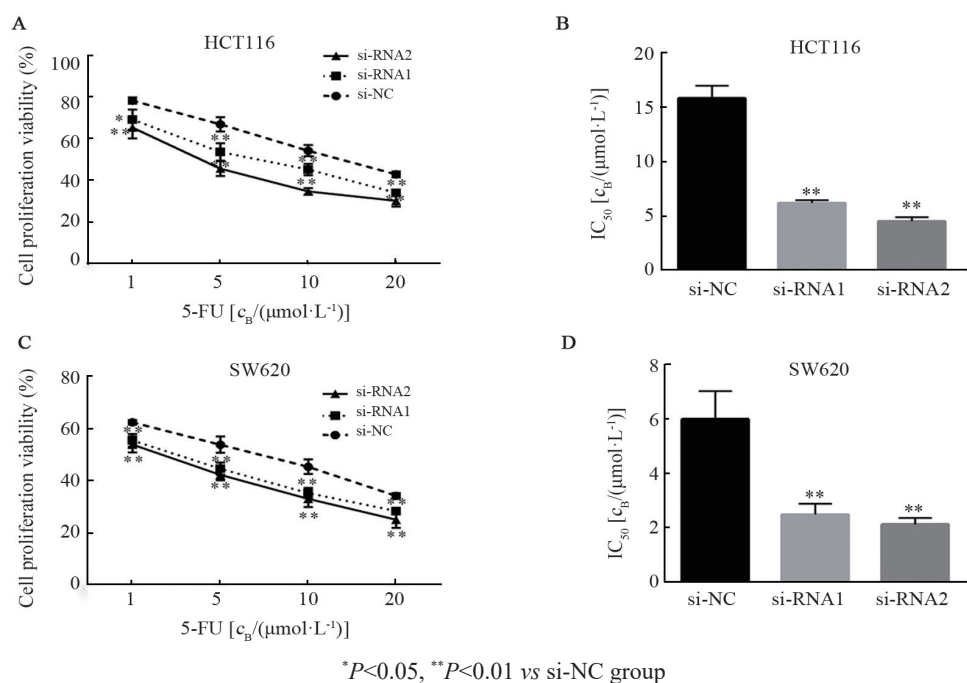


A, B: The mRNA and protein expressions of NEK2 in HCT116 cells were detected by qPCR and WB;

C, D: The mRNA and protein expressions of NEK2 in SW620 cells were detected by qPCR and WB

图2 NEK2 siRNA对CRC细胞NEK2蛋白及mRNA表达的影响

Fig.2 Effect of siRNA NEK2 on the protein and mRNA expressions of NEK2 in CRC cells



A, C: Dose-response curves, correlating drug dose and cell viability, depict the effects of 5-FU on HCT116 and SW620 cell lines;

B, D: Results of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) on the HCT116 and SW620 cells transfected with si-NC, NEK2 siRNA1 or NEK2 siRNA2, respectively

图3 敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞化疗耐药性的影响

Fig.3 Effect of knocking down NEK2 on chemotherapeutic resistance of CRC cells treated with 5-FU

2.4 敲减NEK2可促进5-FU作用下CRC细胞发生G0/G1期阻滞

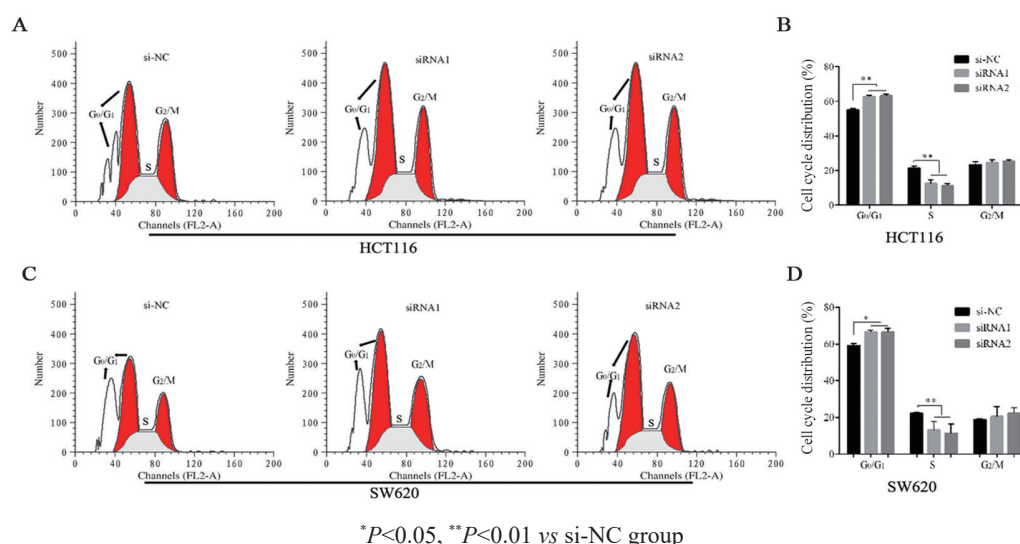
流式细胞术检测结果(图4)显示,HCT116和SW620细胞中阳性干扰组1和阳性干扰组2在5-FU处理后的G0/G1期细胞比例均显著高于阴性

对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),S期细胞比例均显著低于阴性对照组(均 $P < 0.01$),阳性干扰组1和阳性干扰组2与G2/M期细胞比例间无显著差异。

2.5 敲减NEK2促进5-FU作用下CRC细胞的凋亡

V-FICT/PI Annexin双染检测结果显示(图5),

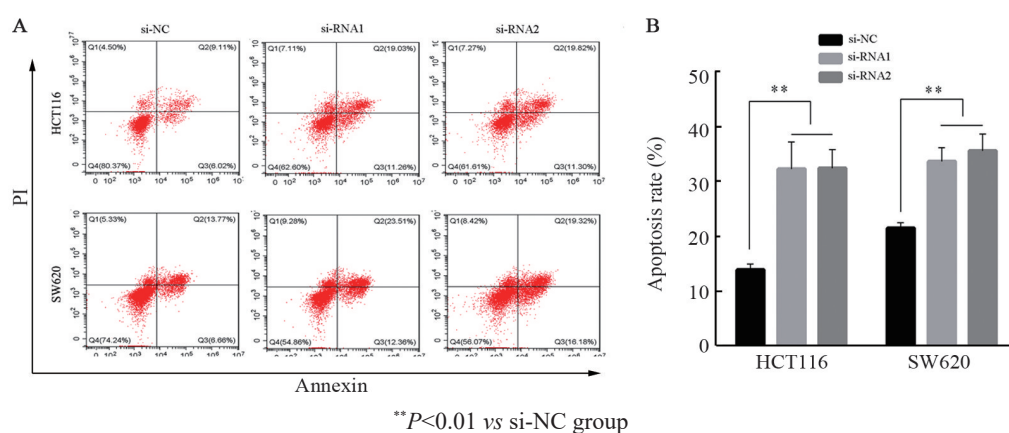
HCT116和SW620细胞中阳性干扰组1和阳性干扰组2在5-FU处理后的细胞凋亡率均显著高于阴性对照组(均 $P<0.01$)。



A, C: Cell cycle distribution in HCT116 or SW620 cells were detected by Flow cytometry; B, D: Cell cycle distribution in HCT116 and SW620 cells expressed as the mean $\pm$ standard deviation and presented in form of histogram

图4 敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞周期分布的影响

Fig.4 Effect of knocking down NKE2 on cell cycle distribution of CRC cells treated with 5-FU



A: Cell apoptosis was detected by FITC Annexin/PI staining analysis; B: Cell apoptosis rate expressed as the mean $\pm$ standard deviation and presented in form of histogram

图5 敲减NEK2对5-FU作用下CRC细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of knocking down NKE2 on apoptosis of CRC cells treated with 5-FU

2.6 敲减NEK2联合5-FU促使CRC细胞中Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达水平发生显著变化

WB检测结果(图6)显示,HCT116和SW620细胞的阳性干扰组1和阳性干扰组2联合5-FU处理后,c-myc、cyclin D1和细胞核 β -catenin的表达水平较阴性对照组显著下降(均 $P<0.01$),细胞质 β -catenin的表达水平较阴性对照组显著增高(均 $P<0.01$)。

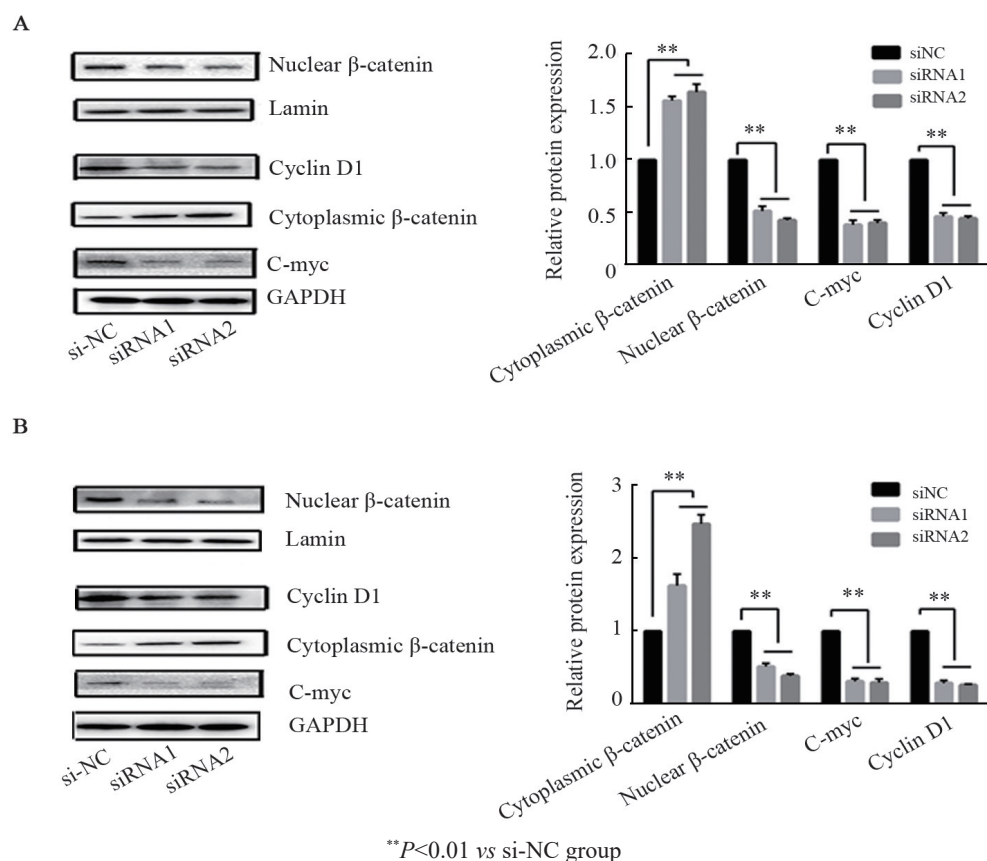
3 讨论

NEK2是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,属于NIMA相关激酶家族成员,可通过磷酸化有丝分裂相关蛋白

参与细胞分裂、中心体稳定、微管稳定、核染色质浓集及纺锤体组装等细胞周期过程^[8-9]。NEK2异常表达与肿瘤发生和耐药性相关。研究^[10-11]发现,NEK2在肝癌组织中高表达并且与患者的临床病理特征及预后密切相关,通过RNA干扰技术敲减NEK2基因可抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。此外,NEK2可通过激活蛋白磷酸酶1(protein phosphatase1, PP1)/AKT及Wnt信号通路介导肝癌细胞对化疗药物5-FU的耐药性,NEK2还可调控 β -catenin蛋白泛素化及在其肝癌细胞中的定位以增强肿瘤细胞对索拉非尼的耐药。SHEN等^[12]发现,NEK2异常高表达是三阴性

乳腺癌患者预后不良的独立危险因素,NEK2通过激活 Wnt 信号通路并促进下游 β -catenin 蛋白从细胞质向细胞核聚集,降低乳腺癌细胞对紫杉醇新辅助化疗的敏感性;而动物实验表明 NEK2 siRNA 结合紫杉醇治疗可显著降低裸鼠肿瘤生长速度。此外,LIU 等^[13]通过检索 Oncomine 数据库发现,NEK2 在宫颈癌组织中高表达, GeneMANIA 分析进一步发现 NEK2 与耐药相关基因 BRCA1、BRCA2、PTEN 和 DAPK1

等相互作用,参与调控细胞周期和微管相关功能,介导卵巢癌的化疗耐药性产生。研究^[14-15]发现 NEK2 在 CRC 组织及细胞中的表达水平异常升高并与 CRC 的分期和预后相关,NEK2 通过改变 β -catenin 在细胞内定位使 CRC 细胞获得侵袭表型并促进 EMT 进程。然而目前有关 NEK2 表达水平与 CRC 化疗耐药关系的研究仍然较少。



A: WB analysis on expression levels of cytoplasmic β -catenin, nuclear β -catenin, c-myc, and cyclin D1 in the NEK2-siRNA1, NEK2-siRNA2 or si-NC transfected HCT116 cells treated with 5-FU; B: WB analysis on expression levels of cytoplasmic β -catenin, nuclear β -catenin, c-myc, and cyclin D1 in the NEK2-siRNA1, NEK2-siRNA2 or si-NC transfected SW620 cells treated with 5-FU

图6 敲减 NEK2 对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of knocking down NEK2 on the expression of Wnt/ β -catenin signal pathway related proteins

本研究首先证实 NEK2 基因在 CRC 细胞中高表达,并且在 HCT116 和 SW620 细胞中有着更高的表达含量。针对 NEK2 基因设计合成 2 条阳性干扰序列并转染 CRC 细胞 HCT116 和 SW620,研究敲减 NEK2 表达与 CRC 细胞对 5-氟尿嘧啶化疗敏感性的关系。本研究发现,敲减 NEK2 表达可显著增强 5-FU 对 CRC 细胞增殖的抑制作用,降低 5-FU 杀伤 CRC 细胞的 IC₅₀ 值。此外,敲减 NEK2 可增强 5-FU 对 CRC 细胞周期的阻滞作用,大部分细胞周期阻滞于 G0/G1 期而 S 期细胞比例显著减少,细胞凋亡率增加。以上结果均表明,转染 NEK siRNA 可有效提高 CRC 细胞

HCT116 和 SW620 对 5-FU 的化疗敏感度。

Wnt/ β -catenin 信号通路是一个进化保守的信号转导器,正常生理条件下参与调控细胞增殖、细胞分化及细胞极性;而在肿瘤进程中,该信号通路还参与肿瘤干细胞的自我更新、肿瘤侵袭转移及肿瘤细胞化疗耐药等病理过程^[16-17]。UPPADA 等^[18]发现,敲减 MASTL 基因可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路增加 CRC 细胞对 5-FU 的化疗敏感性。JIANG 等^[19]发现,UPS22 通过 Wnt/ β -catenin 通路促进 CRC 干细胞自我更新和 5-FU 化疗耐药性的产生。XU 等^[20]发现, HMGA2 基因可与蓬乱蛋白 2 (dishevelled 2, Dvl2) 基

因启动子结合促进其转录,进而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路来增强 CRC 细胞对 5-FU 的化疗抵抗。为进一步研究敲减 NEK2 是否通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路提高 CRC 细胞对 5-FU 的化疗敏感性,本研究通过 WB 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路下游基因 β -catenin、c-myc 和 cyclin D1 的表达,发现在转染 NEK2 siRNA 的 HCT116 和 SW620 细胞中,细胞核 β -catenin、c-myc 和 cyclin D1 表达水平降低,而胞质 β -catenin 蛋白表达水平升高,表明敲减 NEK2 可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路增强 CRC 细胞对 5-FU 的化疗敏感性。然而,本研究仅对可能影响 CRC 细胞中 5-FU 敏感性的通路进行了初步探索,尚待后续更多的研究工作来明确 NEK2 介导耐药的确切机制。

综上所述,敲减 NEK2 基因表达可增强 5-FU 对 CRC 细胞增殖的抑制作用,使细胞发生周期阻滞,介导细胞凋亡,并通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路增强 CRC 细胞对 5-FU 的化疗敏感性。研究结果提示 NEK2 可能作为 CRC 治疗的一个潜在靶点,并在一定意义上可用于改善 5-FU 的耐药性。

【参考文献】

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] GALLAGHER D J, KEMENY N. Metastatic colorectal cancer: from improved survival to potential cure[J]. Oncology, 2010, 78(3/4): 237-248. DOI:10.1159/000315730.
- [3] BAEK S K, LEE K T, BAE S B, et al. Evaluating the recent developments in palliative chemotherapy for metastatic colorectal cancer[J]. Korean J Intern Med, 2019, 34(6): 1188-1196. DOI: 10.3904/kjim.2019.071.
- [4] FRY A M. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure[J]. Oncogene, 2002, 21(40): 6184-6194. DOI: 10.1038/sj.onc.1205711.
- [5] KOKURYO T, YOKOYAMA Y, YAMAGUCHI J, et al. NEK2 is an effective target for cancer therapy with potential to induce regression of multiple human malignancies[J]. Anticancer Res, 2019, 39(5): 2251-2258. DOI:10.21873/anticancer.13341.
- [6] XIA J, HE Y, MENG B, et al. NEK2 induces autophagy-mediated bortezomib resistance by stabilizing Beclin-1 in multiple myeloma[J]. Mol Oncol, 2020, 14(4): 763-778. DOI:10.1002/1878-0261.12641.
- [7] ROBERTS M S, SAHNI J M, SCHROCK M S, et al. LIN9 and NEK2 are core regulators of mitotic fidelity that can be therapeutically targeted to overcome taxane resistance[J]. Cancer Res, 2020, 80(8): 1693-1706. DOI:10.1158/0008-5472.can-19-3466.
- [8] YAO J, FU C, DING X, et al. Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis[J]. FEBS Lett, 2004, 575(1/2/3): 112-118. DOI:10.1016/j.febslet.2004.08.047.
- [9] JEONG Y, LEE J, KIM K, et al. Characterization of NIP2/centrobin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization[J]. J Cell Sci, 2007, 120(pt 12): 2106-2116. DOI: 10.1242/jcs.03458.
- [10] WEN S, LIU Y, YANG M, et al. Increased NEK2 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression and drug resistance by promoting PP1/AKT and Wnt activation[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4): 2193-2199. DOI:10.3892/or.2016.5009.
- [11] DENG L, SUN J Y, CHEN X H, et al. NEK2 augments sorafenib resistance by regulating the ubiquitination and localization of β -catenin in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 1-14. DOI:10.1186/s13046-019-1311-z.
- [12] SHEN H, YAN W, YUAN J, et al. NEK2B activates the Wnt pathway and promotes triple-negative breast cancer chemotherapy-resistance by stabilizing β -catenin[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 243. DOI:10.1186/s13046-019-1231-y.
- [13] LIU X, GAO Y, LU Y, et al. Upregulation of NEK2 is associated with drug resistance in ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(2): 745-754. DOI:10.3892/or.2013.2910.
- [14] NEAL C P, FRY A M, MOREMAN C, et al. Overexpression of the NEK2 kinase in colorectal cancer correlates with beta-catenin relocalization and shortened cancer-specific survival[J]. J Surg Oncol, 2014, 110(7): 828-838. DOI:10.1002/jso.23717.
- [15] TAKAHASHI Y, IWAYA T, SAWADA G, et al. Up-regulation of NEK2 by microRNA-128 methylation is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2014, 21(1): 205-212. DOI:10.1245/s10434-013-3264-3.
- [16] FAROOQI A A, DE LA ROCHE M, DJAMGOZ M B A, et al. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: mechanistic insights[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 65-79. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.01.001.
- [17] ZHANG Q W, ZHANG X T, TANG C T, et al. EGFL6 promotes cell proliferation in colorectal cancer via regulation of the WNT/ β -catenin pathway[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(6): 967-979. DOI:10.1002/mc.22985.
- [18] UPPADA S B, GOWRIKUMAR S, AHMAD R, et al. MASTL induces colon cancer progression and chemoresistance by promoting Wnt/ β -catenin signaling[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 111. DOI:10.1186/s12943-018-0848-3.
- [19] JIANG S, SONG C, GU X, et al. Ubiquitin-specific peptidase 22 contributes to colorectal cancer stemness and chemoresistance via Wnt/ β -catenin pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1412-1422. DOI:10.1159/000489156.
- [20] XU X, WANG Y, DENG H, et al. HMGA2 enhances 5-fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer via the Dvl2/Wnt pathway[J]. Oncotarget, 2018, 9(11): 9963-9974. DOI: 10.18632/oncotarget.24133.

[收稿日期] 2020-04-22

[修回日期] 2020-08-13

[本文编辑] 黄静怡